

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

METHOD AND INSTALLATIONS FOR SEPARATING MAGNETIC PARTICLES IN A FLUID FOR BIOLOGICAL ANALYSIS, AND APPLICATION OF SAID METHOD

Patent number: WO9742503
 Publication date: 1997-11-13
 Inventor: BISCONTE DE SAINT JULIEN JEAN- (FR)
 Applicant: BISCONTE DE SAINT JULIEN JEAN (FR); BIOCOM SA (FR)

Classification:
 - international: G01N33/543
 - european: B03C1/035, G01N1/34B, G01N33/543D4
 Application number: WO1997FR00794 19970505
 Priority number(s): FR19960005727 19960507

Also published as:

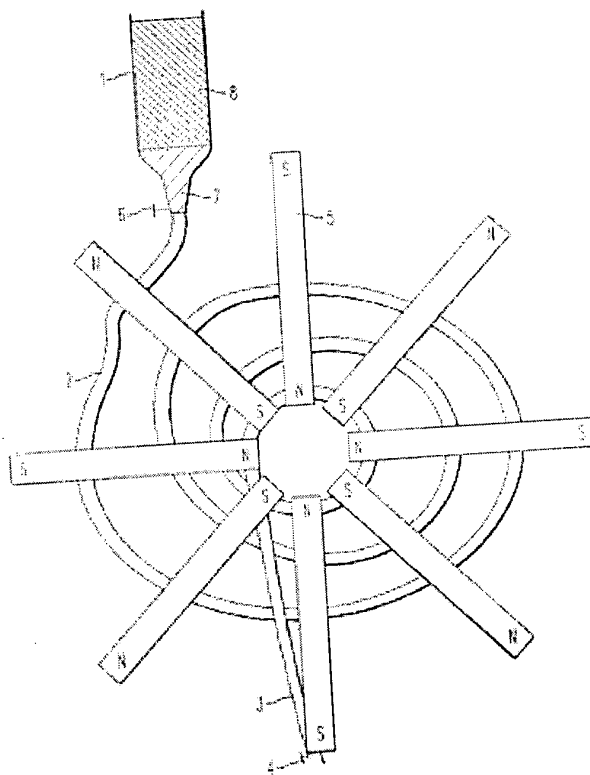
EP0855030 (A1)
 US6143577 (A1)
 FR2748569 (A1)

Cited documents:

EP0206077
 EP0687501
 WO9419690
 EP0339980

Abstract not available for WO9742503
 Abstract of correspondent: **US6143577**

PCT No. PCT/FR97/00794 Sec. 371 Date May 15, 1998 Sec. 102(e) Date May 15, 1998 PCT Filed May 5, 1997 PCT Pub. No. WO97/42503 PCT Pub. Date Nov. 13, 1997A process for magnetic immunoseparation of cells, in particular bacteria, fetal cells, stock cells of bone marrow and circulating cancerous cells, of the type consisting in affixing the target cells on paramagnetic balls and in causing a magnetic field to act on a sample containing the affixed cells, the free cells and the surplus paramagnetic balls, in order to isolate the paramagnetic balls, in that the sample is caused to circulate in a tube the section of which is much less than the length over which the magnetic field is applied.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/543	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/42503
		(43) Date de publication internationale: 13 novembre 1997 (13.11.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00794

(22) Date de dépôt international: 5 mai 1997 (05.05.97)

(30) Données relatives à la priorité:
96/05727 7 mai 1996 (07.05.96) FR(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOCOM S.A.
[FR/FR]; 24, avenue de la Baltique, Z.A. de Courtaboeuf,
Boîte postale 53, F-91942 Le Sulis Cedex (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (US seulement): BISCONTE DE SAINT
JULIEN, Jean-Claude [FR/FR]; 285, rue des Roseaux, F-
91640 Briis sous Forges (FR).(74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra,
F-75001 Paris (FR).(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: METHOD AND INSTALLATIONS FOR SEPARATING MAGNETIC PARTICLES IN A FLUID FOR BIOLOGICAL ANALYSIS, AND APPLICATION OF SAID METHOD

(54) Titre: PROCEDE ET INSTALLATIONS DE SEPARATION DE PARTICULES MAGNETIQUES DANS UN FLUIDE POUR L'ANALYSE BIOLOGIQUE, ET APPLICATION DUDIT PROCEDE

(57) Abstract

The invention discloses a magnetic immunoseparation method of cells, particularly of bacteria, foetal cells, bone marrow stem cells and systemic cancerous cells, consisting in fixing target cells on paramagnetic balls and causing a magnetic field to act on a sample containing the fixed cells, the free cells and the supernumerary paramagnetic balls, to isolate the paramagnetic balls. The sample is circulated in a tube (2), the cross-section of which is much less than the length on which the magnetic field is applied.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé d'immunoséparation magnétique de cellules, en particulier de bactéries, de cellules foetales, de cellules souches de la moelle osseuse et de cellules cancéreuses circulantes, du type consistant à fixer les cellules cibles sur des billes paramagnétiques et à faire agir un champ magnétique sur un échantillon contenant les cellules fixées, les cellules libres et les billes paramagnétiques excédentaires, pour isoler les billes paramagnétiques, que l'on fasse circuler l'échantillon dans un tube (2) dont la section est très inférieure à la longueur sur laquelle s'applique le champ magnétique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCÉDÉ ET INSTALLATIONS DE SÉPARATION
DE PARTICULES MAGNÉTIQUES DANS UN FLUIDE POUR
L'ANALYSE BIOLOGIQUE, ET APPLICATION DUDIT
PROCÉDÉ.

5

La présente invention concerne un procédé et une installation de séparation de particules magnétiques dans un fluide pour l'analyse biologique d'événements rares.

10

L'invention trouve plus particulièrement son application dans les domaines du diagnostic médical et du contrôle de qualité notamment dans l'industrie agro-alimentaire, mais aussi dans le domaine thérapeutique pour détecter et prélever dans des échantillons un type cellulaire à faible occurrence.

15

On peut citer à titre d'exemples d'applications médicales de l'invention :

20

- La séparation de cellules foetales présentent dans le sang maternel. Il s'agit dans ce cas de recueillir, de façon sélective, des cellules présentes à raison de environ 1 cellule foetale pour 10 millions de cellules non foetales. La mise en oeuvre de la présente invention devrait permettre de remplacer les prélèvements à risque de cellules amniotiques.

25

- La préparation de cellules souches de la moelle osseuse permettant de re-ensemencer des moelles détruites à la suite de traitement anticancéreux par chimiothérapie ou radiothérapie. Comme dans le cas des cellules foetales, le nombre de cellules de la moelle osseuse dans le sang périphérique est très inférieur à celui des autres cellules, de l'ordre de 1 pour 200 000.

30

- La détection précoce des cellules cancéreuses circulantes ou micro métastase, qui est du plus haut intérêt pour déterminer des stratégies exploratoires et thérapeutiques. Là encore, l'objectif

est d'isoler et d'identifier 1 cellule pour environ 5 millions de cellules nucléées.

Dans le domaine du contrôle biologique des aliments ou de l'environnement, l'objectif est d'obtenir un résultat rapide sans passer par la phase traditionnelle de multiplication en culture. Les sensibilités attendues sont de l'ordre de 1 cellule (bactérie, levure ou moisissure) pour 1 gramme voire 10 grammes de produit. Il existe dans l'art antérieur de nombreux dispositifs permettant d'atteindre ce but. On peut citer parmi ceux-ci :

- Les méthodes physiques basées sur les différences de taille, de densité ou de charge électrique (De Duve, 1971 ; Zeiller, 1972 ; Pretlow et Pretlow, 1982). Mais ces méthodes présentent un manque de spécificité.

- Les méthodes d'immuno-affinité consistant à fixer un anticorps sur un support, lequel anticorps réagit vis-à-vis d'un motif antigénique présent à la surface des cellules recherchées (Forsgren et Sjoquist, 1986 ; Langone, 1982). Différents procédés dérivant des méthodes d'immuno-affinité, tels que la chromatographie d'affinité (Hunt et al., 1982), ont été proposés.

- La séparation cellulaire associée à une détection de fluorescence relevant de la méthode dite "FACS" pour l'expression anglaise "Fluorescence Activated Cell Sorting". Cette méthode largement décrite met en oeuvre des équipements sophistiqués comprenant un flux liquide dans lequel défilent les cellules. Un faisceau laser excite la fluorescence et déclenche ainsi un signal qui permet de dévier électriquement la cellule dans un récipient. Cette méthode est très efficace et permet d'atteindre un enrichissement de près de 100 % mais elle n'est pas adaptée au tri de populations importantes.

- Les méthodes de séparation magnétique désignées "MACS" pour l'expression anglaise "Magnetic Affinity Cell Sorting", qui reposent sur l'utilisation de particules magnétiques ingérées par les cellules (Melville et al., 1975) ou fixées sélectivement aux cellules par le biais d'anticorps (Molday et al., 1977).

Les méthodes FACS et MACS sont aujourd'hui bien connues et ont déjà donné lieu à une mise en oeuvre industrielle. D'une façon générale, les résultats obtenus avec chacune de ces méthodes diffèrent peu en terme d'efficacité et permettent entre 70 et 100 % de récupération. Toutefois, elles sont plus ou moins adaptées aux diverses applications envisagées.

La présente invention est fondée également sur la mise en oeuvre de particules magnétiques à la surface desquelles est immobilisée une substance capable de se lier spécifiquement à une substance complémentaire libre ou présente sur la surface de cellules. L'analyse est réalisée en milieu liquide en soumettant le milieu biologique dans lequel a été introduit lesdites particules magnétiques à un champ magnétique.

Les particules magnétiques plus particulièrement envisagées dans le cadre de l'invention sont des microbilles du type de celles commercialisées par les Sociétés Dynal, Rhône Poulenc ou Sigma.

Ces microbilles paramagnétiques de taille micronique peuvent comporter à leur surface différents ligands selon l'application qui est envisagée. Ces ligands sont fixés à la surface des microbilles par les techniques décrites dans l'art antérieur, ces ligands peuvent être :

- Des anticorps poly ou monoclonaux spécifiques d'antigènes présents à la surface de certains types cellulaires, comme les protéines CD2, CD4, CD8 exprimées à la surface des lymphocytes T. Ces

anticorps sont fixés à la surface des microbilles par exemple par le biais d'immunoglobulines.

- Des oligonuléotides, par exemple oligo(dT) ou oligo(dA) de tailles variables, biotinylés et donc fixés à la surface des microbilles par le biais de streptavidine. Ces oligonucléotides permettent par hybridation de purifier ou extraire de l'ARN ou de l'ADN d'échantillons préalablement traités de façon à rendre les acides nucléiques qu'il contient aptes à s'hybrider. La mise en oeuvre de ces oligonucléotides fixés à la surface des billes paramagnétiques peut aussi constituer une phase préparative pour un protocole d'amplification par PCR ou un clonage après PCR, ou encore être utilisée pour un séquençage en phase solide.

Les billes ainsi chargées d'un ligand sont mises en contact avec l'échantillon ayant éventuellement subi un traitement préalable, afin de réaliser la ségrégation de l'événement recherchée par l'action d'un champ magnétique.

Mais l'utilisation de cette technique présente l'inconvénient de nécessiter des manipulations multiples et conduit à un ensemble de billes plus ou moins agrégées par l'action de l'aimant parmi lesquelles se trouvent quelques rares cellules. La disproportion du nombre de billes par rapport au nombre de cellules, de l'ordre de 1 pour 10, rend alors l'identification et le recueil de ces cellules impossible. Diverses solutions sont proposées dans l'art antérieur pour supprimer ces inconvénients, comme l'action d'un détergent qui libèrent les noyaux cellulaires mais interdisent ultérieurement l'usage ou l'identification visuelle ou par un anticorps des cellules séparées, ou encore l'usage de produits de détachement qui agissent de façon variable.

Or, dans certains cas, le caractère vital des cellules séparées est primordial, soit parce que l'on envisage une réutilisation thérapeutique des cellules, cas des cellules souches hématopoïétiques, soit une remise en culture cellulaire in vitro pour amplifier un signal, cas des cellules foetales. Les techniques classiques mettant en oeuvre des microbilles décrites ci-dessus peuvent alors avoir une action lésante sur les cellules et empêchent l'utilisation de colonnes séparatrices imposant aux cellules un parcours compliqué et traumatisant.

Les procédés de l'état de la technique ne sont donc pas totalement satisfaisants. Notamment des artefacts réduisent les performances théoriquement prévisibles. En effet, les billes paramagnétiques excédentaires ont parfois tendance à former une gangue emprisonnant totalement une cellule cible. Compte tenu de la très faible occurrence des cellules cibles, ce phénomène est particulièrement néfaste.

Par ailleurs, les opérations de séparation nécessitent le respect minutieux d'un protocole fastidieux et répétitif, qui est source d'erreur.

Le but de la présente invention est donc d'offrir un procédé supprimant les étapes de rinçage et d'élimination des cellules et liquides non recherchés et conjointement la sélection automatique des éléments recherchés et la ségrégation d'avec les billes paramagnétiques libres.

Un autre but de la présente invention est d'améliorer l'efficacité des procédés magnétique en évitant les artefacts relevés dans les procédés de l'art antérieur et en simplifiant le protocole de mise en oeuvre.

Elle a pour but de faciliter la séparation en vue de la numération, de l'analyse, ou du traitement,

de matériel biologique présent à de très faibles concentrations dans un échantillon. Les sensibilités recherchées dans les domaines susvisés peuvent être de l'ordre de 1 cellule pour 1 voire 10 grammes d'échantillon.

On connaît également dans l'état de la technique le brevet européen EP206077.

Ce brevet divulgue le principe général d'immunoséparation magnétique par circulation dans un segment tubulaire placé dans un champ magnétique uniforme. Il est apparu dans certains cas d'utilisation que les particules excédentaires pouvait être attirées trop rapidement au début du tube, et qu'il se créait des agglomérats bloquant la circulation des cellules marquées ou non. Compte tenu de la rareté des cellules cibles, cette situation est très gênante. L'invention vise à remédier à cet inconvénient en proposant de créer un champ magnétique inhomogène. Cette caractéristique évite la formation d'agglomérats de particules non fixées dans la partie amont du segment tubulaire. L'application d'un champ magnétique inhomogène associé au flux produit par l'écoulement de l'échantillon dans le tube de section faible par rapport à la longueur conduit à une meilleure répartition des particules et facilite la libération des agglomérats par l'effet d'entraînement des cellules libres ou fixées, de dimensions supérieures. Ces cellules exercent une légère pression sur les agglomérats de particules magnétiques, qui sont libérés dans les zones de champ faible pour venir se refixer de façon isolées et non plus agglomérées dans la zone de champ fort suivante.

Ces buts sont atteints grâce à un procédé et une installation combinant, après la mise en contact de l'échantillon et des billes, à la fois le flux et la séparation magnétique.

A cet effet, l'invention concerne tout d'abord un procédé de séparation magnétique de cellules, en particulier de bactéries, de cellules foetales, de cellules souches de la moelle osseuse et de cellules cancéreuses circulantes, du type consistant à fixer les cellules cibles sur des billes paramagnétiques et à faire agir un champ magnétique sur un échantillon contenant les cellules fixées, les cellules libres et les billes paramagnétiques excédentaires, pour isoler les billes paramagnétiques, caractérisé en ce que l'on fasse circuler l'échantillon dans un tube dont la section est très inférieure à la longueur sur laquelle s'applique le champ magnétique.

L'échantillon s'écoule de préférence à une vitesse de quelques centimètres par seconde. Les billes excédentaires, en raison de leur densité inférieure à celle des cellules marquées ou non marquées, ou les amas de billes paramagnétiques, du fait de leur forte sensibilité au champ magnétique, sont rapidement attirées contre la paroi du tube et sont immobilisées dans la partie proximale du tube.

Les cellules non fixées sont insensibles au champ magnétique et traversent le tube. Les cellules fixées sur des billes paramagnétiques sont entraînées par le flux à l'intérieur du tube, avant d'être immobilisées contre la paroi du tube, dans la partie distale du tube.

On procède ainsi à une séparation géométrique des composants de l'échantillon, qui permet une récupération des cellules cibles par différents moyens simples à mettre en oeuvre.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré, on fait circuler l'échantillon dans un tube enroulé en spiral placé dans un champ magnétique dont les lignes de

flux sont sensiblement perpendiculaires au plan de la spirale.

Avantageusement, la section du tube est comprise entre 0,5 et 3 millimètres et la longueur du tube est supérieure à 10 centimètres.

De préférence, le tube est placé dans un champ magnétique non homogène. Ce champ peut être produit par un aimant permanent ou par un électroaimant.

Selon une variante avantageuse, la préparation est introduite dans un réservoir raccordé au tube de séparation, ledit réservoir étant surélevé par rapport au tube pour assurer une circulation de l'échantillon par gravité.

L'invention concerne également une installation pour l'immunoséparation magnétique de cellules, en particulier de bactéries, de cellules foetales, de cellules souches de la moelle osseuse et de celles cancéreuses circulantes caractérisée en ce qu'elle est constituée par un tube dont la section est très inférieure à la longueur, ledit tube étant enroulé pour former une spirale, et par au moins un aimant disposé pour créer un champ magnétique sensiblement perpendiculaire au plan de la spirale formée par ledit tube.

Selon un mode de réalisation particulier, elle comporte un tube présentant deux tronçons de section croissante, la deuxième section étant au moins 10 fois supérieure à la première section.

L'invention concerne également des applications de ce procédé pour :

- l'immunofiltration du sang en circulation extracorporelle
- le diagnostic prénatal
- l'analyse biologique en laboratoire.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de ce qui suit, faisant référence aux dessins annexés relatifs à des exemples non limitatifs de réalisation, où :

5 - la figure 1 représente une vue de face d'un dispositif selon l'invention ;

 - la figure 1' représente une vue de face d'un dispositif selon l'invention ;

10 - la figure 2 représente une vue en coupe de la tubulure ;

 - la figure 3 représente une vue d'une variante de réalisation.

 - la figure 4 représente une vue en coupe transversale d'une variante de réalisation ,

15 - la figure 5 représente une vue d'une deuxième variante de réalisation en oeuvre une pompe péristatique ,

20 - la figures 6 représente une vue d'une autre variante de réalisation en oeuvre une pompe péristatique;

 - la figures 6' représente une vue d'une autre variante de réalisation en oeuvre une pompe péristatique;

25 - la figures 6" représente une vue d'une autre variante de réalisation en oeuvre une pompe péristatique;

 - la figure 7 représente une vue en coupe d'un module de filtration pour la séparation des particules magnétiques.

30 La figure 1 représente une vue de face d'un exemple de réalisation d'un dispositif selon l'invention. Il est composé d'un réceptacle (1) pouvant contenir environ 10 à 50 millilitres, raccordé à une tubulure (2) enroulée en spirale et se terminant par une
35 tubulure de sortie (3) munie d'une vanne (4). Un

ensemble d'aimants permanents (5) est disposé radialement pour créer un champ magnétique non homogène. La disposition des aimants est indiquée à titre d'exemple, une disposition différente, par exemple sous forme d'aimants parallèles, étant également applicable. Les aimants (5) sont constitués par des barreaux en samarium-cobalt. Ces barreaux magnétiques peuvent éventuellement être montés sur un disque support rotatif. Cette variante permet d'entraîner à une étape du procédé les billes paramagnétiques fixées vers la sortie de la tubulure. A titre d'exemple, ils tournent alternativement de $\pm 20^\circ$. La vitesse maximale d'entraînement est de quelques millimètres par secondes, de façon à optimiser l'efficacité sur les particules paramagnétiques.

On peut prévoir différents modes d'entraînement des aimants :

Si le mouvement se fait continûment dans le sens de l'écoulement, on facilitera l'évacuation des cellules et des particules ;

Si le mouvement se fait continûment en sens inverse de l'écoulement, on retardera l'évacuation des cellules et des particules ;

Si le mouvement est alternatif, on réalisera un brassage des particules facilitant le rinçage et l'élimination des cellules et des particules.

La section de la tubulure (2) est d'environ 0,5 millimètres. Elle est réalisée en un matériau tel que le TEFLON (marque déposée). La longueur est d'environ 50 centimètres.

L'utilisation du dispositif est la suivante:

a) on introduit tout d'abord un liquide de rinçage de type PBS (nom commercial) dans une pipette de 20 millilitres ;

b) on aspire l'échantillon de sang (7) qui a été préalablement incubé avec des particules paramagnétiques. On ajoute 9 millilitres de sérum physiologique (8).

5 c) on connecte le réceptacle (1) à la tubulure en spirale (2) en évitant scrupuleusement la formation de bulles ;

d) on surélève le réceptacle (1) de 30 centimètres environ par rapport à la spirale

10 e) on ouvre la vanne (6) prévue entre le réceptacle (1) et la tubulure (2). Les liquides s'écoulent alors continûment du réceptacle (1) vers la tubulure (2) en spirale sous l'effet de la pression hydrostatique.

15 f) on arrête l'écoulement après avoir laisser passer la moitié des 20 millilitres de liquide de rinçage. On peut, pendant cette phase, augmenter l'efficacité du rinçage en faisant tourner les aimants (5) de façon alternative, par exemple en répétant 5 fois
20 un cycle de déplacement de 20° dans le sens trigonométrique, puis retour à la position initiale, puis 20° dans le sens antitrigonométrique.

L'étape suivante consiste à la récupération des rosettes ou des noyaux des cellules recherchées.

25 1) Récupération des rosettes

On éloigne la spirale (2) de l'influence des barreaux magnétiques (5), et on reprend l'écoulement du reste de liquide de rinçage. Celui ci va entraîner toutes les particules paramagnétiques et les cellules porteuses de particules paramagnétiques. Les particules
30 recherchées pourront ainsi être récupérées par filtrage, à l'aide d'un filtre laissant passer les particules paramagnétiques, mais pas les cellules.

35 2) Récupération des noyaux des cellules recherchées.

Pour récupérer les noyaux des cellules, on maintiendra l'influence magnétique et on fera agir un nouveau réactif qui aura la propriété de lyser les cellules fixées en libérant les noyaux durcis et colorés. A titre d'exemple, un tel réactif est constitué par le mélange suivant :

- Détergent, par exemple CETRIMIDE (Marque commerciale)
- Fixateur, par exemple formaldéhyde
- Colorant nucléaire, par exemple iodure de propidium.

Ce mélange est introduit dans le réceptacle (1) de telle sorte que le volume ne dépasse pas celui de la spirale (2). La coloration facilite la visualisation de la progression du liquide. On laisse ce mélange en contact 10 minutes avec la spirale. On actionne en mouvements alternés les aimants pour faciliter la libération des noyaux. On peut alors rincer pour récupérer les noyaux purs. Les aimants (5) étant toujours présents, aucune particule magnétique ne viendra contaminer la préparation. En revanche, les cellules étant détruites, l'identification des noyaux implique l'utilisation de réactifs d'hybridation moléculaire. Ceux-ci permettent de détecter des anomalies génétiques comme la présence d'un centromère surnuméraire (trisomie 21) ou des expressions amplifiées d'oncogènes, ou encore des expressions de gènes particuliers type P53. Par ailleurs, les noyaux purs colorés de façon stoechiométriques permettent de définir un niveau de ploïde qui caractérise les stades de cellules tumorales.

La figure 1 présente une variante de réalisation d'un dispositif selon l'invention. Le dispositif comporte trois récipients (31 à 33) de réactifs et d'échantillons reliés à un tuyau séparateur

(35) enroulé en spirale. Des robinets ou vannes automatiques ouvrent ou ferment le débit de chacun des récipients (31 à 33) vers le tuyau séparateur (35). Ce tuyau séparateur est placé dans un gradient de champ magnétique engendré par des aimants permanents (36) disposés en étoile, en sens radial alterné. L'extrémité aval du tuyau séparateur (35) débouche d'une part dans un tuyau de recueil (37) et d'autre part dans un tuyau d'évacuation (38). Des vannes ou robinets sont prévus sur chacun de ces tuyaux pour commander l'écoulement sous vers un récipient de rejet (39), sous vers des moyens d'analyse formés par un système de recueil sur filtre (40), par un récipient de recueil (41) ou par un détecteur de flux de particules (42).

La figure 2 représente une vue en coupe d'un segment de tubulure. Sous l'effet des forces de Bernoulli, les particules ont tendance à se concentrer dans le centre du flux, où la vitesse est la plus importante. Sous l'effet des flux magnétiques, les billes paramagnétiques (10) plus légères et moins volumineuses que les particules non marquées (11) que les cellules marquées (12) sont très rapidement attirées vers la paroi (13) de la tubulure.

La trajectoire des cellules non marquées (11) n'est pas perturbée par les flux magnétiques et celles-ci restent donc dans le centre du flux où elles sont rapidement entraînées vers la sortie.

Les cellules (12) marquées se retrouvent dans la dernière partie de la tubulure (2). Eventuellement, la tubulure peut être réalisée par deux segments de section croissante, la première servant à retenir les billes excédentaires, et la seconde à retenir les cellules marquées.

Les figures 3 et 4 représentent des vues respectivement en coupe médiane et en coupe transversale d'une variante de réalisation.

La tubulure (2) est formée par une rainure (14) réalisée dans une plaque de matière plastique (15). Elle débouche d'une part sur l'un des bord latéraux pour permettre le raccordement à une tubulure de liaison avec le réceptacle (1) d'alimentation, et d'autre part avec un orifice transversal (16) traversant la plaque (15) permettant l'évacuation des fluides. Le dispositif est formé de deux plaques symétriques (15, 15') et sont raccordées de manière à définir entre elles la tubulure de circulation du liquide. Elles présentent sur les surfaces extérieures des logements pour les aimants (17).

La figure 5 représente une vue d'une deuxième variante de réalisation mettant en oeuvre une pompe péristaltique. Dans cette variante, la progression des liquides n'est pas conditionnée par la gravité, mais par une pompe péristaltique.

Le dispositif est constitué par un élément tubulaire (22) formant une boucle séparatrice. L'une des extrémités aspire l'échantillon traité comme dans les exemples précédents. L'élément tubulaire (22) est disposé dans le champs d'aimants permanents (24 à 28) orientés perpendiculairement à la direction de déplacement du liquide, en sens alternés. L'élément tubulaire (22) est jetable, ce qui évite toute contamination de ses parois intérieures.

Cet élément tubulaire (22) est raccordé au tube d'aspiration d'une pompe péristaltique (29) de type connu. Les déchets sont recueillis dans un tube d'essai (30) à la sortie de la pompe (29). La circulation du fluide à l'intérieur du tube est de préférence continu, avec une vitesse de l'ordre de 1 cm par seconde. La

circulation en continu évite la formation d'adhésions cellulaires sur la paroi du tube de séparation.

Les figures 6, 6 et 6" représentent une vue partielle d'une variante de réalisation. Les aimants forment une cage d'écureuil (32) constitué par une pluralité de barreaux magnétiques (33 à 40) aimantés radialement en sens alterné. Cette structure permet de positionner un ou plusieurs éléments tubulaires (22), et de traiter en parallèle plusieurs échantillons.

L'utilisation d'un tel dispositif est la suivante :

- on immerge l'extrémité libre (23) du tuyau séparateur (22) dans l'échantillon qui a reçu au préalable les particules paramagnétiques.

- on met en action la pompe (29) qui va faire passer les particules magnétiques et les cellules dans la boucle séparatrice disposée dans le champ magnétique. Les particules magnétiques et les rosettes constituées par les cellules marquées vont s'arrêter dans cette boucle tandis que les autres cellules vont s'évacuer. Pour procéder ainsi à une purge cellulaire, notamment dans un but thérapeutique, consistant à éliminer les cellules marquées afin de ne recueillir que les cellules non marquées, il est préférable de remplacer la pompe péristaltique par un autre moyen d'aspiration, par exemple une seringue aspirante ou une source de dépression, afin d'éviter l'écrasement des cellules non marquées.

Ce mode de réalisation présente plusieurs avantages :

- il permet de traiter en parallèle un grand nombre d'échantillons,

- il permet d'automatiser la gestion des étapes,

- il permet de traiter de très grand volumes,

- il évite les volumes morts en amont de la zone de traitement de l'élément tubulaire. En effet, après le passage de l'échantillon, on peut éliminer le tube et passer les réactifs à partir de récipients non contaminés. Le risque de récupérer des cellules non spécifiques est très réduit. Par ailleurs, on peut alors faire plonger tous les tuyaux dans le même récipient réactif, ce qui simplifie les manipulations.

La séparation des cellules marquées et des particules magnétiques non fixées après la mise en oeuvre d'un système de traitement selon l'une des variantes précédentes s'effectue avantageusement au moyen d'un dispositif de filtration dont un exemple de réalisation est décrit en figure 7.

La recherche d'événements aussi rares que les cellules foetales ou les micrométastases implique d'extrêmes qualités et efficacité de toutes les étapes du procédé. Il faut tout d'abord que les anticorps soient très efficaces pour assurer une bonne récupération des cellules visées. Il faut éviter les pertes cellulaires lors des manipulations de rinçage et de recueil. Il faut aussi réduire au maximum les faux positifs résultant de cellules non spécifiques, mais aussi de cristaux de colorants et de résidus variés qui en fluorescences peuvent se confondre avec des cellules.

L'analyse d'image est capable de résoudre certaines discriminations. Toutefois, dans le cas d'éléments rares de l'ordre de 1 à 50 cellules par échantillon, le nombre total d'artefact doit rester inférieur à ces valeurs, ce qui nécessitent des performances élevées de la chaîne de séparation des cellules marquées et des cellules non marquées, et une grande qualité de la récupération des cellules. Les

procédures habituelles de recueil sur lame et de coloration génèrent un "bruit" qui n'est pas compatible avec de telles exigences.

5 Le dispositif de filtration selon l'invention permet par contre de répondre à ces exigences. Il est constitué par une pièce (41) en silicone moulé, à usage unique. Cette pièce (41) présente une épaisseur de l'ordre de 2 millimètres et présente douze protubérances (51) d'un diamètre de 6
10 millimètres et d'une hauteur de 10 millimètres. Ces protubérances (51), normalement obturées, peuvent être perforées par une aiguille creuse (48) prévue à l'extrémité du tube séparateur (42).

15 La pièce en silicone (41) est positionnées dans une plaque perforée (43) rigide. Les perforations sont disposées de manière complémentaire aux protubérances (51) de la pièce (41). Cette plaque (43) peut être raccordée de manière étanche à un support (45) et maintenu en position par des griffes (44). Un joint
20 torique vient compléter l'étanchéité de cet assemblage. Le support (45) présente également des perforations disposées en regard des perforations de la plaque (43). Le support est raccordé à une source de dépression. Une membrane de filtration microporeuse (47) est disposée
25 entre la plaque (43) et le support (45). Il s'agit avantageusement d'une membrane microporeuse en polycarbonate dont les alvéoles présentent une section de 2 microns.

30 Le fonctionnement de ce module de filtration est le suivant :

La pièce (41) est livrée avec un film protecteur placé sous la face inférieure. On peut ouvrir une ou plusieurs protubérances. On place la plaque (41) sur le support (43) après avoir positionnée la membrane

microporeuse, et on verrouille l'ensemble à l'aide des griffes (44).

Le tube de séparation (2) est livré avec un capuchon protecteur qui évite toute contamination. On retire ce capuchon et on perfore l'une des protubérances de la pièce (41).

Lors du recueil des rosettes issues du séparateur, les particules paramagnétiques isolées traversent la membrane tandis que les rosettes restent en surface. La porosité de la membrane microporeuse laisse passer les particules paramagnétiques dont la section est de l'ordre du micron, mais pas les rosettes, dont la section est de l'ordre de 5 microns.

Pour le recueil des noyaux, en l'absence de billes, la porosité peut être de 1 à 2 microns.

La coloration peut se faire avant la filtration par des colorants fluorescents de type IP ou BET (nom commerciaux) ou encore par coloration sur le filtre après que ce dernier ait été extrait du système de contention.

L'association d'un dispositif séparateur formé par un tube de section très inférieure à la longueur placé dans un gradient de champ magnétique, et d'un système de filtration tel que décrit ci-dessus, présente de nombreux avantages. Une telle association facilite tout d'abord l'automatisation de l'analyse biologique. Elle permet également de procéder à des analyses et à des utilisations à fins thérapeutiques nécessitant un haut degré de stérilité. Les billes paramagnétiques permettent un tri des cellules, et notamment une séparation des cellules recherchées et des autres cellules. Le filtre permet d'éliminer certaines cellules excédentaires, telles que des plaquettes, ainsi que les billes paramagnétiques excédentaires. Le filtre a également pour fonction la concentration des cellules

5 rares recherchées sur une surface réduite facilitant l'analyse par imagerie. Ce filtre permet également, pour des applications thérapeutiques notamment, de procéder à une culture des cellules recherchées. A cet effet, le filtre sert de support de cellules et peut être alimenté avec un liquide nutritif propre à favoriser la multiplication cellulaire.

L'invention sera mieux comprise dans ce qui précède à titre d'exemple non limitatif.

REVENDICATIONS

1 - Procédé d'immunoséparation magnétique de cellules, en particulier de bactéries, de cellules foetales, de cellules souches de la moelle osseuse et de cellules cancéreuses circulantes, du type consistant à fixer les cellules cibles sur des billes paramagnétiques et à faire agir un champ magnétique sur un échantillon contenant les cellules fixées, les cellules libres et les billes paramagnétiques excédentaires, pour isoler les billes paramagnétiques, caractérisé en ce que l'on fait circuler l'échantillon dans un tube (2) dont la section est très inférieure à la longueur sur laquelle s'applique le champ magnétique inhomogène.

2 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on fait circuler l'échantillon dans un tube (2) enroulé en spirale placé dans un gradient de champ magnétique.

3 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la section du tube est comprise entre 0,5 et 3 millimètres.

4 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la longueur du tube est supérieure à 10 centimètres.

5 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la préparation est introduite dans un réservoir raccordé au tube de séparation, ledit réservoir étant surélevé par rapport au tube pour assurer une circulation de l'échantillon par gravité.

6 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'on introduise sans mélange et sans couche interface dans le

réservoir un premier volume de l'échantillon et un second volume d'un liquide de rinçage.

5 7 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la préparation est aspirée dans le tube placé dans le gradient de champs magnétique, l'extrémité aval dudit tube étant reliée à une pompe péristaltique.

10 8 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les aimants sont mobiles par rapport au tube, de préférence selon un mouvement alternatif.

15 9 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les réactifs et les échantillons s'écoulent de façon continue dans le tube de séparation magnétique, à une vitesse comprise entre 0,1 cm/s et 10 cm/s.

20 10 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon la revendication précédente caractérisé en ce que l'on procède à une étape ultérieure de filtration à l'aide d'un filtre à membrane microporeuse dont la porosité est supérieure au diamètre des billes paramagnétiques et inférieure au diamètre des cellules
25 fixées.

30 11 - Procédé d'immunoséparation magnétique selon la revendication précédente caractérisé en ce que l'on procède à une étape ultérieure de filtration à l'aide d'un filtre à membrane microporeuse dont la porosité est supérieure au diamètre des billes paramagnétiques et de certaines des cellules excédentaires, et inférieure au diamètre des cellules fixées.

12 - Dispositif de filtration pour la mise en oeuvre du procédé d'immunoséparation magnétique selon la revendication 10 ou 11 caractérisé en ce qu'il est constitué par un filtre à membrane microporeuse dont la porosité est supérieure au diamètre des billes paramagnétiques et de certaines des cellules excédentaires, et inférieure au diamètre des cellules fixées.

13 - Installation pour l'immuno-séparation magnétique de cellules, en particulier de bactéries, de cellules foetales, de cellules souches de la moelle osseuse et de celles cancéreuses circulantes caractérisée en ce qu'elle est constituée par un tube dont la section est très inférieure à la longueur et par au moins un aimant disposé pour créer un champ magnétique dans l'espace traversé par ledit tube.

14 - Installation pour l'immuno-séparation magnétique de cellules selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un réservoir disposé en amont du tube.

15 - Installation pour l'immuno-séparation magnétique de cellules selon la revendication 13 ou 14 caractérisée en ce qu'elle comporte un tube présentant deux tronçons de section croissante, la deuxième section étant au moins 10 fois supérieure à la première section.

16 - Installation pour l'immuno-séparation magnétique de cellules selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle comporte deux plaques symétriques (15, 15') présentant une rainure formant une spirale, lesdites plaques supportant des aimants.

17 - Installation pour l'immuno-séparation magnétique de cellules, en particulier de bactéries, de cellules foetales, de cellules souches de la moelle osseuse et de cellules cancéreuses circulantes caractérisée en ce qu'elle est constituée par un tube

dont la section est très inférieure à la longueur, ledit tube présentant une première extrémité pour l'aspiration de l'échantillon et une seconde extrémité reliée à une pompe péristaltique, le tube étant placé dans un gradient de champs magnétiques.

18 - Installation pour l'immuno-séparation magnétique de cellules, en particulier de bactéries, de cellules foetales, de cellules souches de la moelle osseuse et de celles cancéreuses circulantes selon la revendication 17 caractérisée en ce que les champs magnétiques alternés sont produits par des aimants permanents disposés en cage d'écureuil.

19 - Dispositif de filtration pour la mise en oeuvre du procédé de séparation selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il est constitué par un support relié de manière étanche à une source de dépression, et par un couvercle complémentaire présentant des moyens pour le raccordement de l'extrémité aval du tube de séparation cellulaire, la membrane de filtration interchangeable étant disposée entre le support et le couvercle.

20 - Dispositif de filtration selon la revendication 19 caractérisé en ce que le couvercle est constitué par une plaque perforée et par une pièce moulée présentant des zones perforables par l'extrémité d'un ou de plusieurs tubes de séparation cellulaire.

21 - Procédé de séparation de cellules foetales présentes dans le sang maternel caractérisé en ce que l'on fixe les cellules cibles sur des microbilles paramagnétiques à l'aide d'un ligand capable de se lier spécifiquement à une substance complémentaire libre ou présente à la surface de cellules et en ce que l'on fait circuler l'échantillon à travers une tubulure présentant une longueur très supérieure à la section, ladite tubulure traversant un champ magnétique non homogène.

22 - Procédé de détection précoce des cellules cancéreuses circulantes ou micro métastase caractérisé en ce que l'on fixe les cellules cibles sur des microbilles paramagnétiques à l'aide d'un ligand capable de se lier spécifiquement à une substance complémentaire libre ou présente à la surface de cellules et en ce que l'on fait circuler l'échantillon à travers une tubulure présentant une longueur très supérieure à la section, ladite tubulure traversant un champ magnétique non homogène.

23 - Procédé de préparation de cellules, notamment de souches de la moelle osseuse permettant de re-ensemencer des moelles détruites à la suite de traitement anticancéreux par chimiothérapie ou radiothérapie caractérisé en ce que l'on fixe les cellules cibles sur des microbilles paramagnétiques à l'aide d'un ligand capable de se lier spécifiquement à une substance complémentaire libre ou présente à la surface de cellules et en ce que l'on fait circuler l'échantillon à travers une tubulure présentant une longueur très supérieure à la section, ladite tubulure traversant un champ magnétique non homogène.

24 - Procédé de préparation de cellules, notamment de souches de la moelle osseuse permettant de re-ensemencer des moelles détruites à la suite de traitement anticancéreux par chimiothérapie ou radiothérapie selon la revendication précédente caractérisé en ce que l'on procède à une filtration des cellules ressortant de la tubulure placée dans le champ magnétique, à l'aide d'un filtre à membrane présentant une porosité supérieure à la section des billes paramagnétiques, et inférieure aux cellules recherchées fixées.

Fig. 1

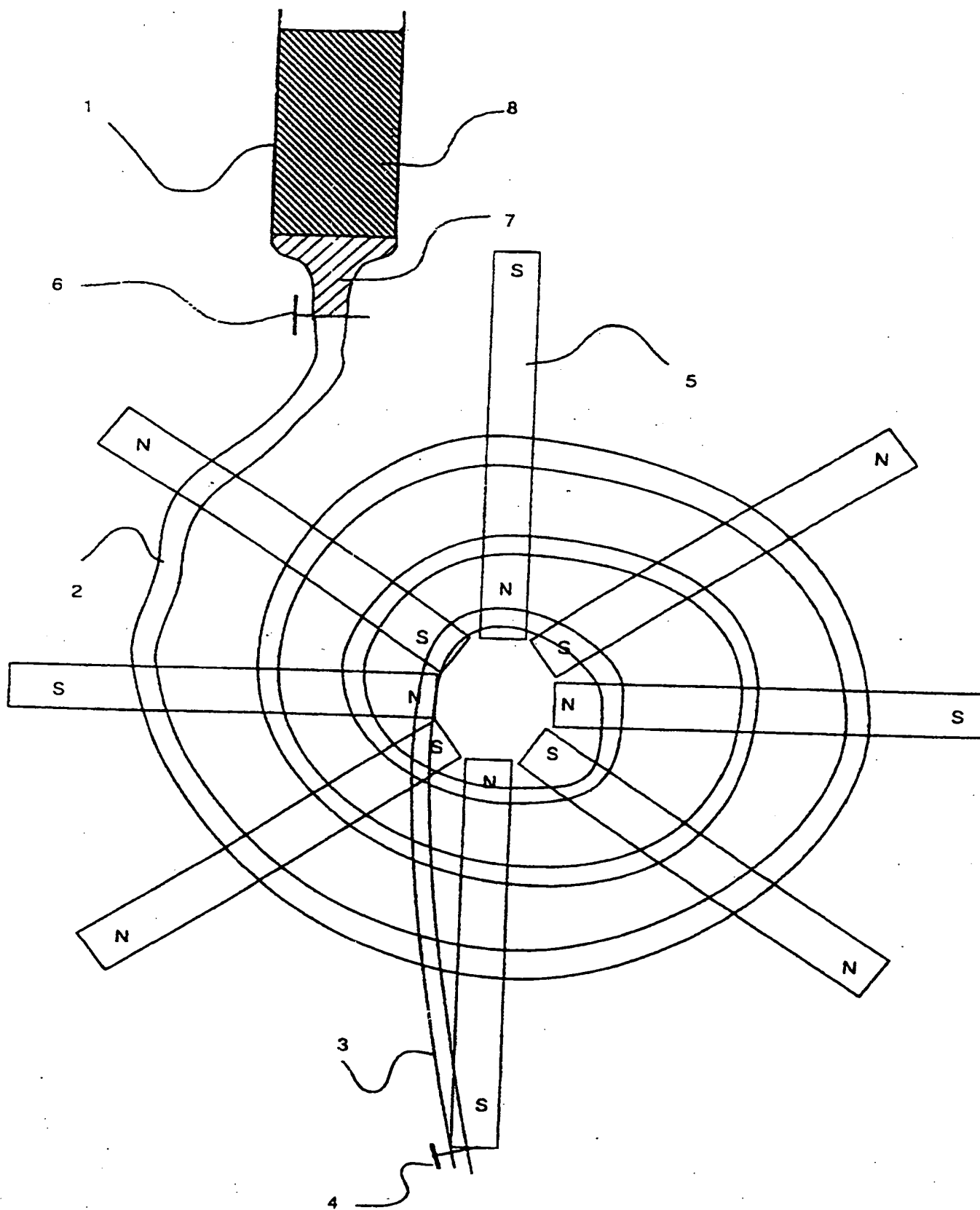
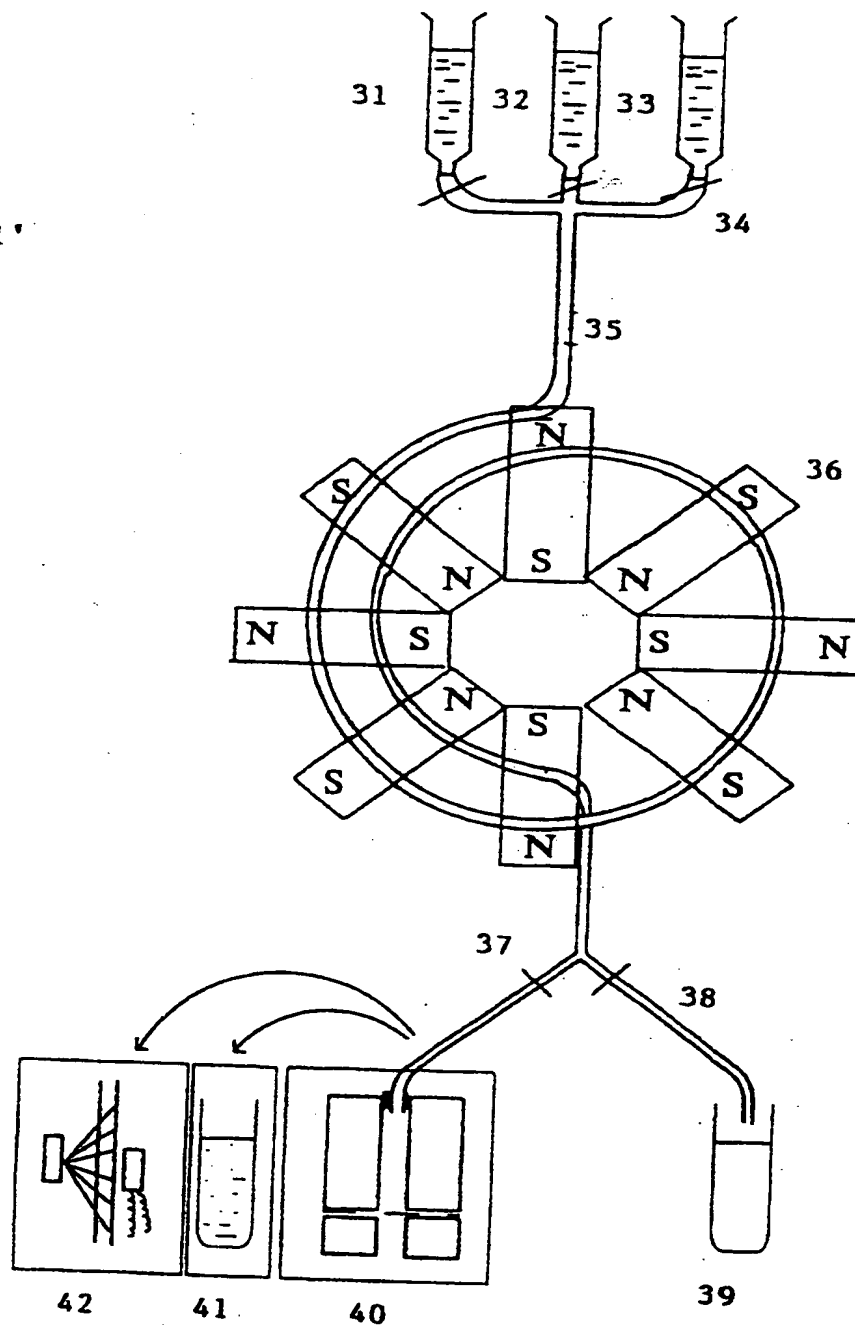
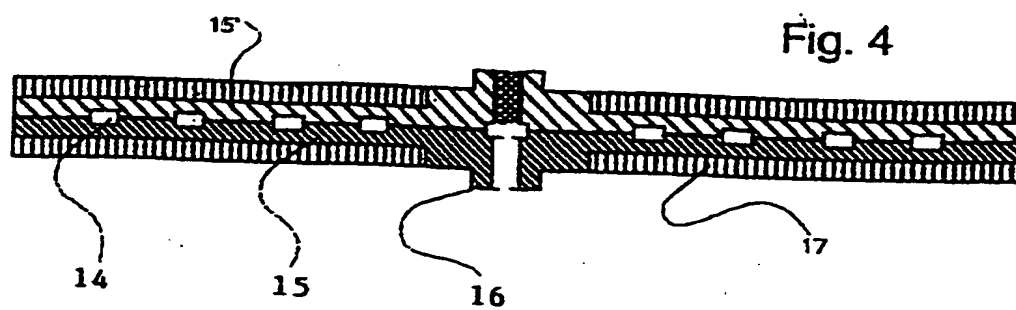
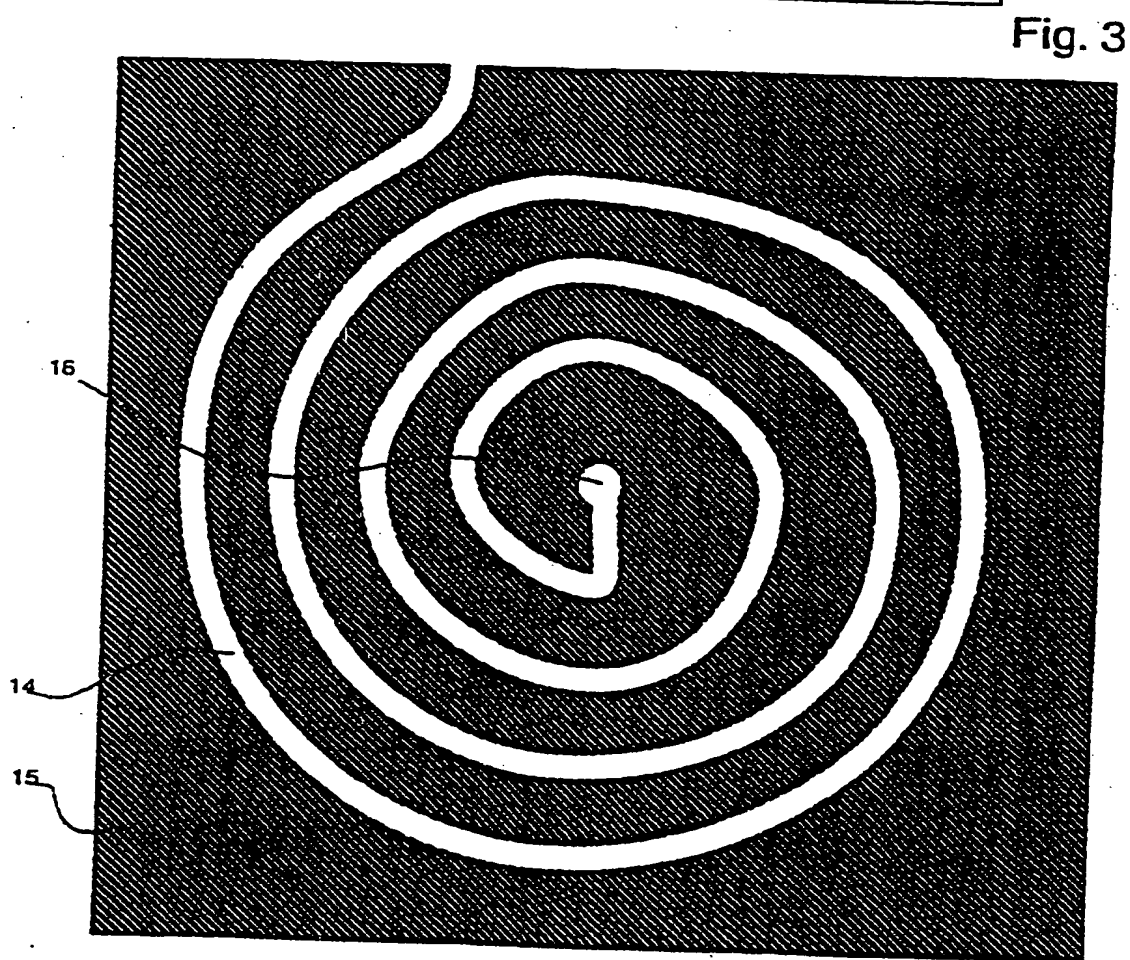
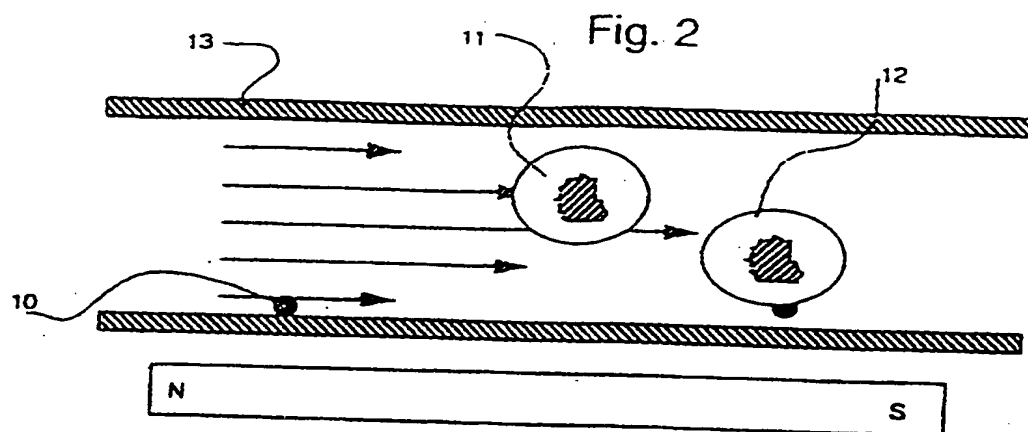
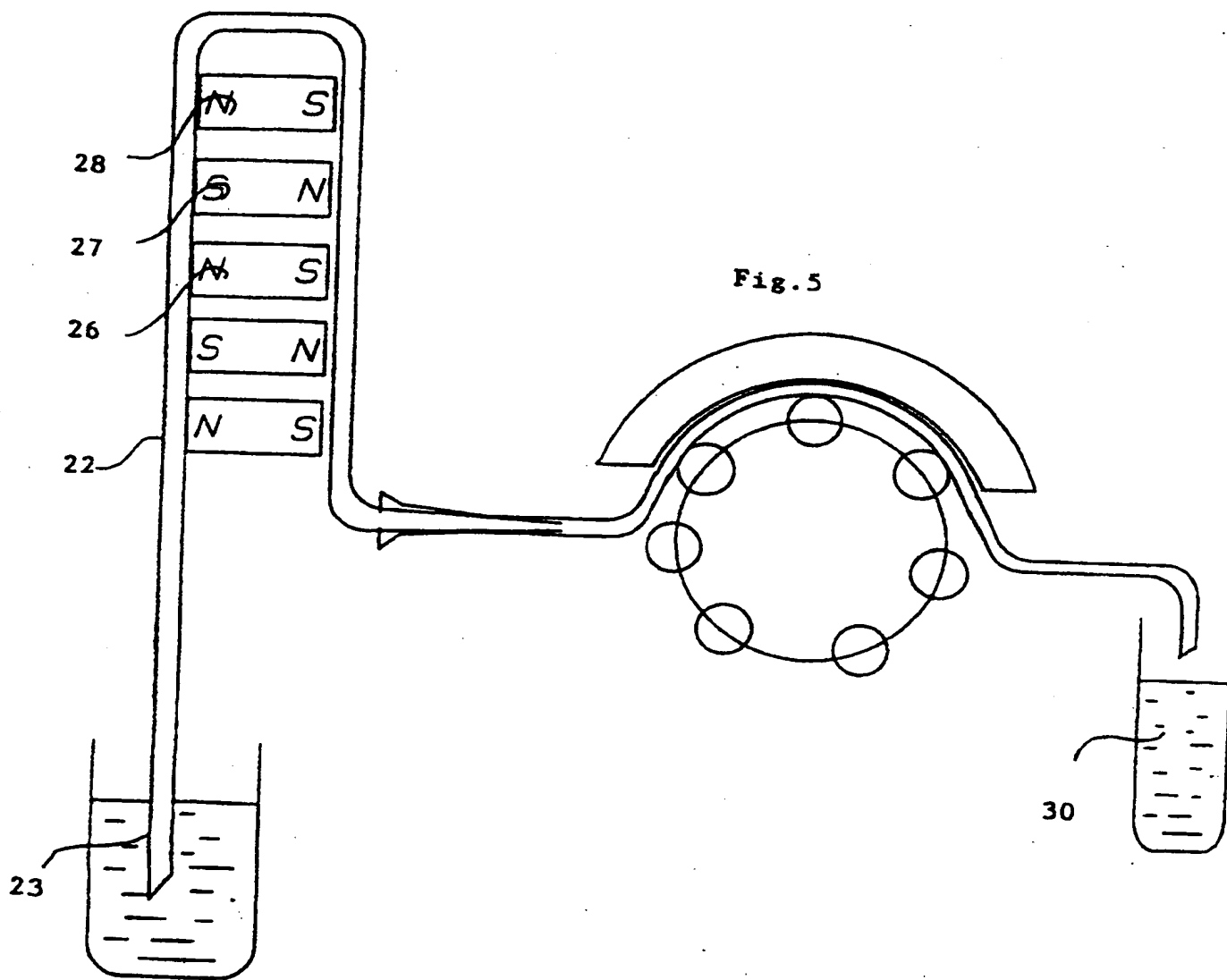
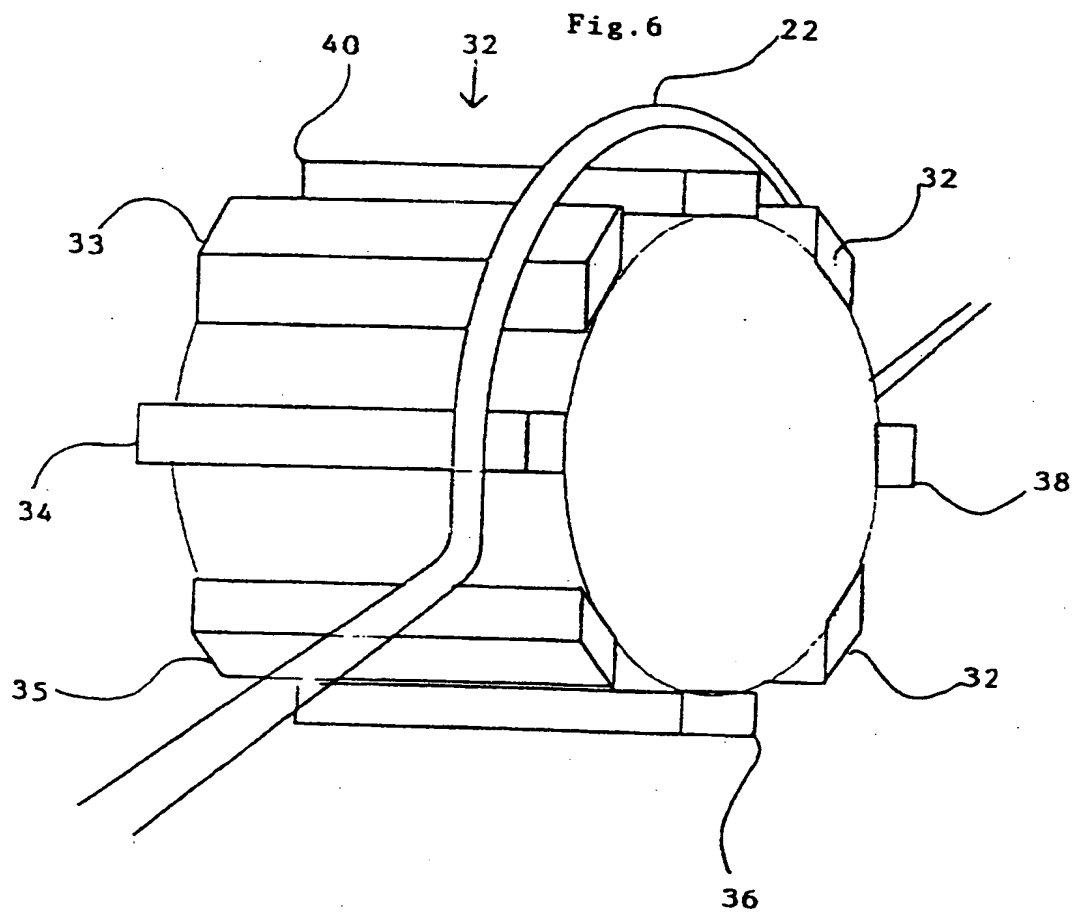


Fig. 1'









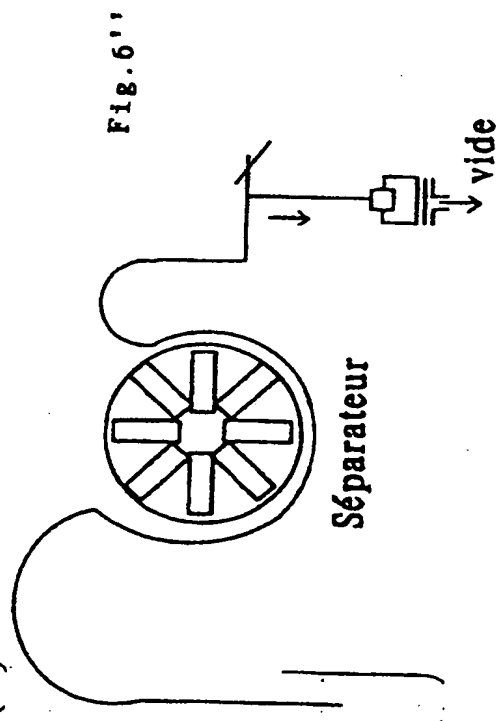
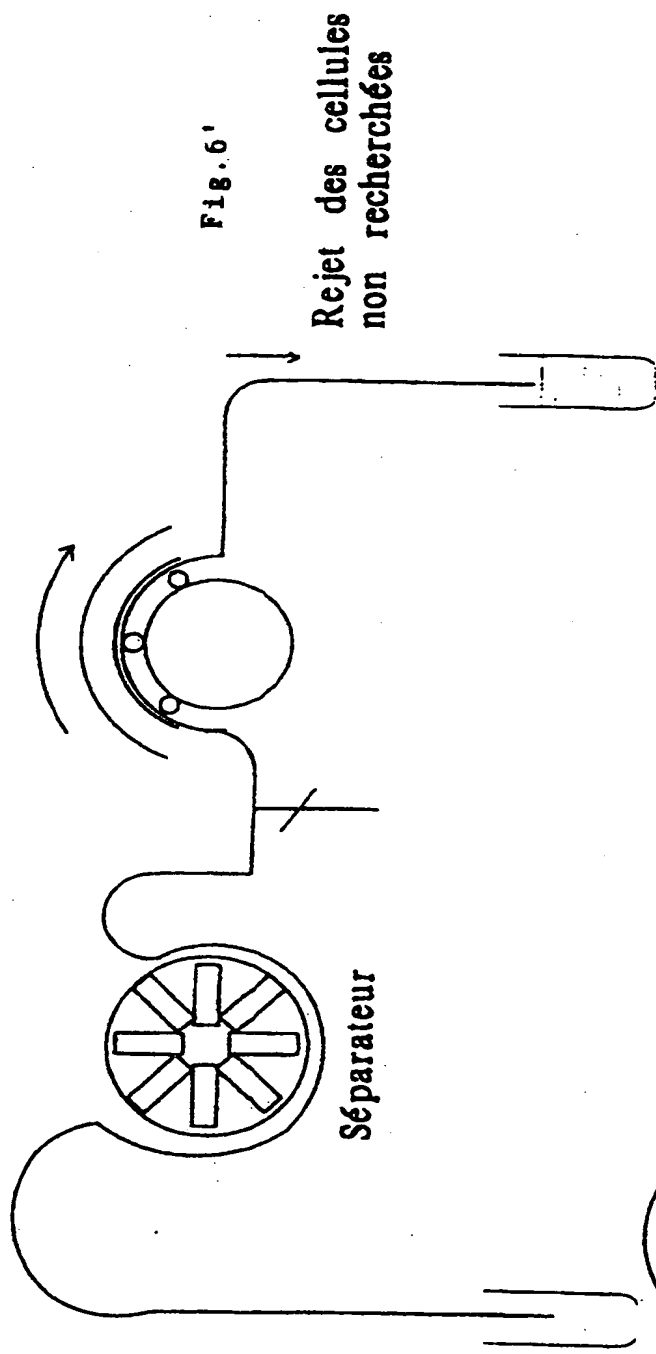
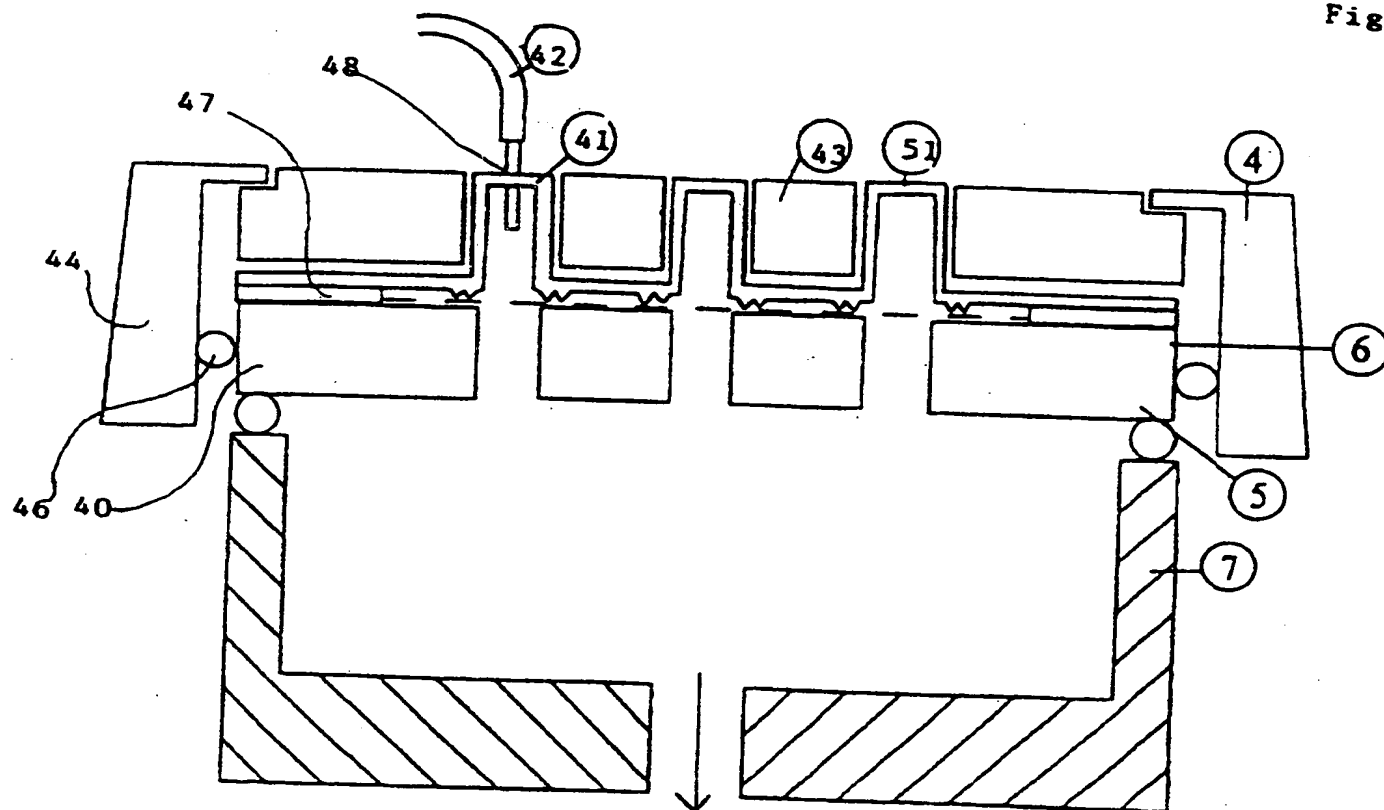


Fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 97/00794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 206 077 A (BAYER AG) 30 December 1986 cited in the application see the whole document	1-4,6,7, 13,15, 17,21-23
Y	---	5,14
Y	EP 0 687 501 A (PRECISION SYST SCIENCE CO LTD) 20 December 1995 see abstract; figure 2	5,14
A	WO 94 19690 A (CARDIOVASCULAR DIAGNOSTICS INC) 1 September 1994 see abstract	8
A	EP 0 339 980 A (NIPPON TELEGRAPH AND TELEPHONE CORPORATION) 2 November 1989 -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 August 1997

Date of mailing of the international search report

20 -08- 1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Ceder, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No

PCT/FR 97/00794

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0206077 A	30-12-86	DE 3522365 A	02-01-87
		JP 61293562 A	24-12-86
		US 4738773 A	19-04-88
EP 0687501 A	20-12-95	JP 8062224 A	08-03-96
		AU 2042995 A	21-12-95
		CA 2151324 A	16-12-95
		CN 1127359 A	24-07-96
		NZ 272248 A	29-01-97
WO 9419690 A	01-09-94	AU 6173494 A	14-09-94
		CA 2156174 A	01-09-94
		EP 0685069 A	06-12-95
		JP 8507148 T	30-07-96
		US 5601991 A	11-02-97
EP 339980 A	02-11-89	JP 2253551 A	12-10-90
		JP 7021442 B	08-03-95
		JP 1273584 A	01-11-89
		JP 1321362 A	27-12-89
		JP 2118431 A	02-05-90
		JP 2567068 B	25-12-96
		JP 2151767 A	11-06-90
		DE 68916843 D	25-08-94
		DE 68916843 T	02-02-95
		US 5498550 A	12-03-96
		US 5340749 A	23-08-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 97/00794

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 206 077 A (BAYER AG) 30 Décembre 1986 cité dans la demande	1-4,6,7, 13,15, 17,21-23
Y	voir le document en entier	5,14
Y	EP 0 687 501 A (PRECISION SYST SCIENCE CO LTD) 20 Décembre 1995 voir abrégé; figure 2	5,14
A	WO 94 19690 A (CARDIOVASCULAR DIAGNOSTICS INC) 1 Septembre 1994 voir abrégé	8
A	EP 0 339 980 A (NIPPON TELEGRAPH AND TELEPHONE CORPORATION) 2 Novembre 1989	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 Août 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20 -08- 1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ceder, 0

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 97/00794

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0206077 A	30-12-86	DE 3522365 A	02-01-87
		JP 61293562 A	24-12-86
		US 4738773 A	19-04-88

EP 0687501 A	20-12-95	JP 8062224 A	08-03-96
		AU 2042995 A	21-12-95
		CA 2151324 A	16-12-95
		CN 1127359 A	24-07-96
		NZ 272248 A	29-01-97

WO 9419690 A	01-09-94	AU 6173494 A	14-09-94
		CA 2156174 A	01-09-94
		EP 0685069 A	06-12-95
		JP 8507148 T	30-07-96
		US 5601991 A	11-02-97

EP 339980 A	02-11-89	JP 2253551 A	12-10-90
		JP 7021442 B	08-03-95
		JP 1273584 A	01-11-89
		JP 1321362 A	27-12-89
		JP 2118431 A	02-05-90
		JP 2567068 B	25-12-96
		JP 2151767 A	11-06-90
		DE 68916843 D	25-08-94
		DE 68916843 T	02-02-95
		US 5498550 A	12-03-96
		US 5340749 A	23-08-94
